



19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 199 38 839 A 1**

61 Int. Cl. 7:
G 01 N 33/48
G 01 N 33/543
C 12 Q 1/68

21 Aktenzeichen: 199 38 839.3
22 Anmeldetag: 17. 8. 1999
43 Offenlegungstag: 10. 8. 2000

DE 199 38 839 A 1

68 Innere Priorität:
199 04 288. 8 03. 02. 1999

71 Anmelder:
Europäisches Laboratorium für Molekularbiologie
(EMBL), 69117 Heidelberg, DE

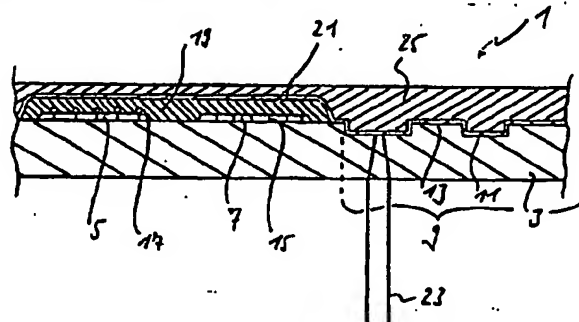
74 Vertreter:
H. Weickmann und Kollegen, 81679 München

72 Erfinder:
Hörber, Johann Karl Heinrich, Dr., 91744
Weiltingen, DE; Becker, Peter B., Prof. Dr., 80336
München, DE

Die folgenden Angaben sind den vom Anmelder eingereichten Unterlagen entnommen

54 Verfahren zum Nachweis von Analyten in einer Meßprobe sowie Meßträger hierfür

57 Es wird ein Verfahren zum Nachweis von Analyten in einer Meßprobe vorgeschlagen, bei dem auf einem scheibenförmigen Substrat (3) auf einer seiner Flachseiten analytspezifische Binder (15) in einer Vielzahl von Nachweisfeldern (5, 7) immobilisiert werden, sodann die Meßprobe in Kontakt mit den Nachweisfeldern (5, 7) gebracht wird und anschließend das Vorhandensein oder/und die Menge der nachzuweisenden Analyten (17) durch optische Auswertung der Nachweisfelder (5, 7) ermittelt wird. Erfindungsgemäß wird ein aus einem optisch transparenten Material gefertigtes Substrat (3) verwendet, wobei die Nachweisfelder (5, 7) längs mindestens einer Spirallinie (27) verteilt auf dem Substrat (3) angeordnet werden. Nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern (5, 7) wird das Substrat (3) auf seiner die Nachweisfelder (5, 7) tragenden Flachseite flächig mit einer Reflexionsschicht (21) versehen. Alternativ ist statt der optischen Auslesung auch eine magnetische Auslesung des Substrats denkbar.



DE 199 38 839 A 1

Beschreibung

Die Erfindung befaßt sich mit dem Nachweis von Analyten in einer Meßprobe. Als Analyten kommen beispielsweise Proteine, Peptide, Nukleinsäuren und deren Derivate sowie Moleküle, die an diesen binden können, in Frage.

Als Meßprobe kommt jede Probe in Frage, von der vermutet wird, daß sie mindestens einen Teil der gesuchten Analyten enthält. Es kann sich dabei z. B. um eine Blutprobe, eine Serumprobe oder/und eine Urinprobe handeln, oder allgemein um jede Lösung, die den gesuchten Analyten enthält.

Zum Nachweis von Analyten in einer Meßprobe ist der Einsatz sogenannter Bindungsassays bekannt. Bei solchen Bindungsassays werden im allgemeinen Analyten durch ihre spezifische Wechselwirkung mit Rezeptoren nachgewiesen. Beispiele für solche Wechselwirkungen sind Protein/Protein-Wechselwirkungen, die beispielsweise während der Genexpression auftreten, Enzym/Substrat- oder Enzym/Effektor-Wechselwirkungen, die im Stoffwechsel auftreten, oder Protein/DNA- oder Protein/RNA-Wechselwirkungen während der Genexpression. Ein systematisches Verständnis dieser molekularen Wechselwirkungen ist eine Grundvoraussetzung für das Verständnis aller biologischen Vorgänge sowohl in normalen als auch in erkrankten Zellen.

Weiterhin können mit Bindungsassays auch Nukleinsäuren nachgewiesen werden. DNA/DNA-Wechselwirkungen spielen eine Hauptrolle in der Molekularbiologie, insbesondere bei der Identifizierung von Genen und bei Strategien zur Kartierung von DNA, beim Nachweis und der Quantifizierung der Genexpression sowie bei der molekularen Diagnose oder Therapie von Erkrankungen. In Frage kommen selbstverständlich auch DNA/RNA- und RNA/RNA-Wechselwirkungen.

Aufgrund der großen Anzahl von Genen, Proteinen, chemischen Effektoren oder RNA-Aptameren erfordert ein Verstehen oder Eingreifen in biochemische Prozesse häufig die Erkennung, Quantifizierung oder Klassifizierung einer Vielzahl von molekularen Wechselwirkungen oder die Identifizierung von wirksamen Wechselwirkungspartnern aus einer großen Anzahl von möglichen Kombinationen. Das Screening und Analysieren einer großen Anzahl von molekularen Wechselwirkungen ist bei den im Stand der Technik bekannten Verfahren jedoch häufig begrenzt.

Meßproben sollen oftmals auf eine Vielzahl von Analyten hin untersucht werden. Dabei ergibt sich das Problem, daß bei der Auswertung große Datenmengen anfallen. Um in der Praxis erfolgreich zu bestehen, muß die Auswertung jedoch in vertretbarer Zeit möglich sein. Bekannte Analysesysteme haben sich hier als nur bedingt zufriedenstellend erwiesen.

Aus einem Artikel "Metal Nano Clusters as Transducers for Bioaffinity Interactions" von Thomas Schalkhammer in Monatshefte für Chemie 000,1-26, Springer-Verlag 1998, Seiten 1-26, ist ein Sensoraufbau für biorekognitive Bindungsvorgänge und katalytisch-enzymatische Prozesse bekannt, bei dem auf einem Polycarbonat-Substrat eine Spiegelschicht aus Silber und darüber eine Abstandsschicht aus einem Polymermaterial angeordnet sind. Die Abstandsschicht dient ihrerseits als Träger für die darauf immobilisierten Binder. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe von Metall-Clustern, mit denen die nachzuweisenden Analyten markiert werden und die in elektromagnetische Wechselwirkung mit der metallischen Spiegelschicht treten. In Sensorbereichen starker Überdeckung mit gebundenen Metall-Clustern wird Licht, das von der dem Polycarbonat-Substrat abgewandten Seite der Spiegelschicht her eingestrahlt wird, stärker absorbiert als in überdeckungsfreien oder schwächer überdeckten Sensorbereichen, was die optische Auslesung

des Sensors über Absorptionsmessungen ermöglicht.

Für die Funktion dieses bekannten Sensors ist die Dicke der Abstandsschicht ein entscheidender Parameter. Diese muß in einem vorgegebenen Bereich gewählt werden, der von der Wellenlänge des bei der späteren Auswertung eingestrahlt Lichts abhängt. Es muß insbesondere sichergestellt sein, daß die Abstandsschicht auf ihrer gesamten Ausdehnung eine gleichmäßige Dicke besitzt. Hierfür ist ein hoher herstellungstechnischer Aufwand zu betreiben.

In dem angesprochenen Artikel werden für die optische Auswertung dieses Sensors schon Lesegeräte vorgeschlagen, die es erlauben, auch größere Datenmengen zu bewältigen, unter anderem CD-ROM-Lesegeräte.

Aufgabe der Erfindung ist es, einen Weg aufzuzeigen, wie mit geringem Aufwand, nicht nur was die datentechnische Auswertung anbelangt, sondern auch was die Bereitstellung des Sensors anbelangt, eine Meßprobe auf eine große Fülle von Analyten hin untersucht werden kann.

Bei der Lösung dieser Aufgabe geht die Erfindung nach einem ersten Aspekt von einem Verfahren zum Nachweis von Analyten in einer Meßprobe aus, bei dem auf einem scheibenförmigen Substrat auf einer seiner Flachseiten analytenspezifische Binder in einer Vielzahl von Nachweisfeldern immobilisiert werden, sodann die Meßprobe in Kontakt mit den Nachweisfeldern gebracht wird und anschließend das Vorhandensein oder/und die Menge der nachzuweisenden Analyten durch optische Auswertung der Nachweisfelder ermittelt wird.

Erfindungsgemäß ist hierbei vorgesehen, daß ein aus einem optisch transparenten Material gefertigtes Substrat verwendet wird, daß die Nachweisfelder längs mindestens einer Spirallinie oder/und einer Vielzahl konzentrischer Kreislängen verteilt auf dem Substrat angeordnet werden und daß nach Inkontaktbringung der Meßprobe mit den Nachweisfeldern ein optischer Reflektor der die Nachweisfelder tragenden Flachseite des Substrats benachbart angeordnet wird.

Bei der Erfindung können die Nachweisfelder direkt auf dem Substrat ausgebildet werden. Hierbei kann es sich empfehlen, die Substratoberfläche zunächst chemisch vorzubehandeln oder durch Vorbehandlung mit einem Sauerstoffplasma eine Oberflächenmodifizierung zu bewirken. Diese Modifikation kann das Aufbringen der Binder zur Ausbildung der analytenspezifischen Nachweisfelder erleichtern. Unterhalb der Binder ist bei der Erfindung demnach keine Abstandsschicht mit einer präzise einzuhaltenden Dicke auf das Substrat aufzubringen, wie dies bei dem von Schalkhammer bekannten Sensor zwingend erforderlich ist. Insofern ergibt sich ein reduzierter fertigungstechnischer Aufwand.

Der Reflektor wird für die optische Auswertung des Assays benötigt. Er kann von einer Reflexionsschicht gebildet werden, die nach Abschluß der molekularbiologischen Verfahrensschritte auf das Substrat über den Nachweisfeldern aufgebracht wird. Aufgrund ihres guten Reflexionsvermögens empfehlen sich metallische Werkstoffe. Grundsätzlich sind auch andere Materialien denkbar, etwa Dielektrika. Bevorzugt wird die Reflexionsschicht aus Aluminium gebildet. Denkbar ist auch Silber als Material für die Reflexionsschicht. Die Reflexionsschicht kann durch chemisches Aufdampfen ausgebildet werden. Möglich ist aber auch, eine vorgefertigte reflektierende Folie auf das Substrat aufzukleben.

Alternativ ist es denkbar, daß der Reflektor im Abstand von dem Substrat angeordnet wird, er also nicht direkt auf das Substrat aufgebracht wird. Beispielsweise kann der Reflektor von einer Spiegelplatte gebildet sein, die in einem Auswertegerät angebracht ist, welches zur Auswertung des